

藤黄灰链霉菌 099 生产麦拓莱霉素与脂肪酸酯的关系

王志平, 李良智, 元英进

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要: 为确定藤黄灰链霉菌 099 经聚酮途径合成麦拓莱霉素与初级代谢产物脂肪酸酯间的关系, 利用柱层析, 对发酵液中的脂肪酸酯加以分离纯化, 用核磁共振谱、电喷雾电离质谱鉴定其结构, 构建该菌株合理的代谢关系, 并通过添加脂肪酸的发酵实验加以验证. 结果表明该菌株中不仅存在聚酮合成途径, 而且存在脂肪酸酯代谢途径.

关键词: 代谢; 麦拓莱霉素; 藤黄灰链霉菌 099; 脂肪酸酯

中图分类号: TQ465.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)06-0670-05

1 前言

麦拓莱霉素^[1,2]作为藤黄灰链霉菌 099 的次级代谢产物, 具有抗 COX 病毒、抗变异链球菌等活性, 毒性研究的安全指数显示具有低毒高效特性, 更有意义的是该抗生素还有抗 HIV 蛋白酶活性, 有可能开发成新型的抗艾滋病新药. 藤黄灰链霉菌 099 的代谢研究也引起了研究者的关注. 由于微生物的代谢途径十分复杂, 除受菌体自身基因调控外, 胞外营养条件的变化也可通过信号传递刺激菌体开启相关调控. 研究^[3,4]表明, 抗生素的生物合成受到培养基中的速效碳源(葡萄糖)、氮源(铵离子)及其分解代谢中间产物和磷酸盐的调控, 但由于胞内中间代谢产物分离与分析困难, 报道大多集中在调控作用, 未能对其代谢进行更加深入的探讨, 因而缺乏实际应用价值.

由于代谢网络的复杂性, 对其中全部的酶和中间代谢产物分离鉴定十分困难. 为达到事半功倍的效果, 需要对其代谢有一个基本的认识. 麦拓莱霉素属于大环内酯类抗生素, 其生物合成途径为聚酮类代谢途径^[5-8], 聚酮合成可能与初级代谢产物脂肪酸酯合成有一定的关系. 本研究对麦拓莱霉素的发酵液进行脂肪酸酯的分离和结构鉴定, 以构建其中相关的初级代谢与次级代谢关系, 并通过实验验证模型中的代谢途径.

2 材料与方法

2.1 实验试剂

菌种: 藤黄灰链霉菌 099(*Streptomyces regensis* 099).

培养基: 下述培养基均用自来水配制.

细菌培养基: 牛肉膏蛋白胨固体培养基.

固体斜面培养基(g/L): 葡萄糖 0.05, 可溶性淀粉

0.2, 蛋白胨 0.02, 琼脂 0.2, K_2HPO_4 0.01, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005, NaCl 0.005; 玉米浆 0.02 mL, 调节 pH 为 6.3, 121 °C 灭菌 15 min.

一级种子培养基(g/L): 葡萄糖 5, 可溶性淀粉 20, 蛋白胨 4, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5; 玉米浆 2.0 mL, 调节 pH 为 6.0, 121 °C 灭菌 15 min.

二级种子培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 可溶性淀粉 40.0, 蛋白胨 4.0, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5; 玉米浆 2.0 mL, 调节 pH 为 6.0, 121 °C 灭菌 15 min.

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 可溶性淀粉 40.0, 酵母粉 5.0, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5, 泡敌 0.9; 玉米浆 2.0 mL, 调节 pH 为 6.8, 121 °C 灭菌 15 min.

石油醚(分析纯, 天津试剂二厂), 乙酸乙酯(分析纯, 天津试剂二厂).

2.2 主要仪器与设备

DHZ-C 大容量恒温震荡器(江苏太仓实验设备厂), 30 L 发酵罐(德国 B. Braun 公司), 玻璃快速层析柱(45 mm×500 mm, 天津大学玻璃加工厂), 柱层析用硅胶 [200~300 目(48~75 μm), 青岛海洋化工厂], 真空薄膜蒸发仪(Büch Instrument, Germany), 高分辨快原子轰击质谱仪(Bruker Daltonics Inc. APEX II, Swiss), 400 MHz 核磁共振仪(Bruker-AV400, Swiss).

2.3 实验方法

2.3.1 发酵培养方法及发酵液的预处理

藤黄灰链霉菌 099 在固体斜面培养基上于 28 °C 培养 7 d, 至孢子成熟. 将活化好的斜面孢子转接于一级种子培养基, 培养 48 h 后转接到二级摇瓶种子培养基中, 培养 24 h 后转接到 30 L 发酵罐中. 采用枯草杆菌杯碟法监测发酵液活性, 液相电喷雾质谱(HPLC-ESI/MS)

收稿日期: 2004-12-29, 修回日期: 2005-04-25

基金项目: 国家 863 高新技术规划资助项目(编号: 2001AA214081)

作者简介: 王志平(1974-), 男, 黑龙江省牡丹江市人, 博士研究生, 研究方向: 天然产物的分离纯化; 元英进, 通讯联系人, Tel: 022-27403888, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn.

检测麦拓莱霉素的含量。发酵液以 4800 r/min 离心 20 min, 上清液用经无水 Na_2SO_4 干燥的石油醚(沸点 60~90 °C)萃取 5 次, 合并萃取液, 用旋转蒸发器真空浓缩至淡黄色油状物, 待分离纯化。

2.3.2 脂肪酸酯的正相硅胶层析方法分离纯化

取一定量 200~260 目(55~75 μm)硅胶, 重蒸甲醇洗涤至无杂质, 110 °C 活化 1 h, 真空装柱; 将浓缩至淡黄色的油状物以适量的石油醚(沸点 60~90 °C)溶解, 取溶解的样品适量, 少量硅胶吸附, 减压蒸干, 上柱, 以石油醚-乙酸乙酯体系从 100:0 至 100:10 梯度洗脱, 用玻璃瓶手工收集, 对石油醚萃取液部位进行分离, 同时用薄层层析检测各组分的纯度。

2.3.3 脂肪酸酯的结构鉴定方法

将所得两个脂肪酸酯化合物用核磁共振和质谱等鉴定结构。

3 结果与讨论

3.1 脂肪酸酯溶媒萃取工艺的确定

脂肪酸及脂肪酸酯的极性很低, 可以被石油醚萃取。取上清液用等体积石油醚萃取 5 次, 第 5 次时萃取液中薄层荧光板检测不到脂肪酸酯类成分, 即可认为已将其

从上清液中萃取完全, 减压薄膜蒸发回收石油醚。

3.2 脂肪酸酯的结构鉴定

3.2.1 脂肪酸酯化合物 A 的结构鉴定

化合物 A 为无色油状物, 核磁共振图谱综合解析为邻苯二甲酸-4-甲基-庚酯(Phthalic acid bis-4-methyl-heptylester), 分子式 $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$, 分子量 390.3, 结构式如图 1。

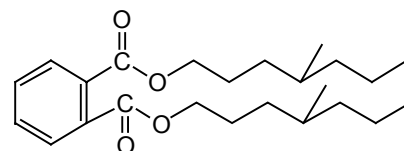


图 1 邻苯二甲酸-4-甲基-庚酯结构

Fig.1 Structure of phthalic acid bis-4-methyl-heptylester

化合物 A 的核磁共振谱(图 2) $^1\text{H-NMR}$ 显示芳香质子信号 7.648 和 7.462, 可知分子呈现对称性。 $^{13}\text{C-NMR}$ 显示碳总数为 24 个, 其中有 2 个羰基碳(167.63), 2 个季碳(132.3), 10 个亚甲基碳(68.00, 38.62, 30.26, 28.82, 23.65), 6 个次甲基碳(130.78, 128.69, 22.89)及 4 个甲基碳(13.95, 10.86)。分子中含有苯环结构, 为邻苯二甲酸脂肪酸酯衍生物。

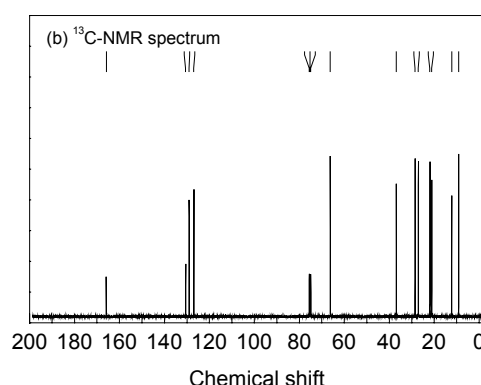
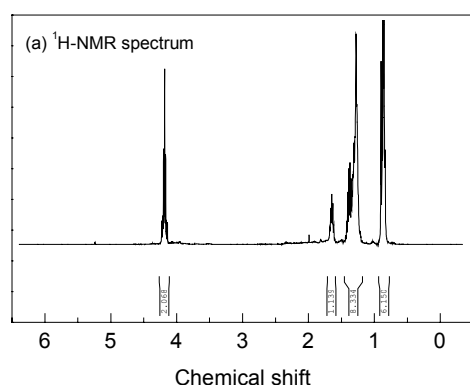


图 2 化合物 A 的核磁共振谱

Fig.2 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of compound A

通过对化合物 A 的质谱解析, 可以对核磁共振结构分析手段进行相互确认。电喷雾质谱(ESI)在正电离方式时得准分子离子峰 391 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ (见图 3), 这与其结构相符合, 因此确认该化合物为邻苯二甲酸-4-甲基-庚酯。

3.2.2 脂肪酸酯化合物 B 的结构鉴定

化合物 B 为无色油状物, 核磁共振图谱综合解析为邻苯二甲酸-4-甲基-戊酯(Phthalic acid bis-4-methyl-pentylester), 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$, 分子量 334.2, 结构式如图 4。

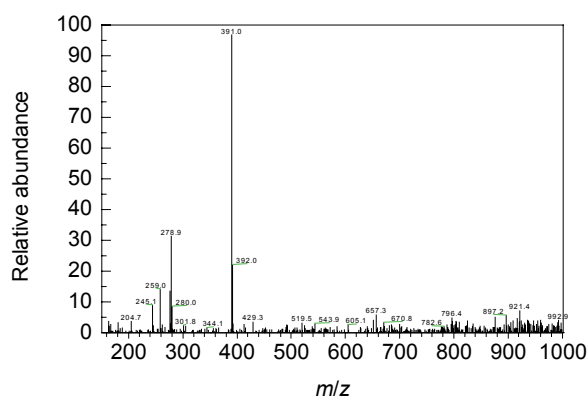


图 3 化合物 A 的质谱图

Fig.3 The mass spectrum of compound A

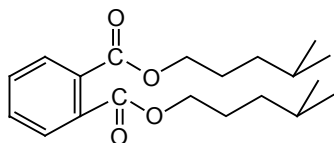


图4 邻苯二甲酸-4-甲基-戊酯结构
Fig.4 Structure of phthalic acid bis-4- methyl-pentylester

从化合物 B 的核磁共振谱(图 5)数据分析, 分子中

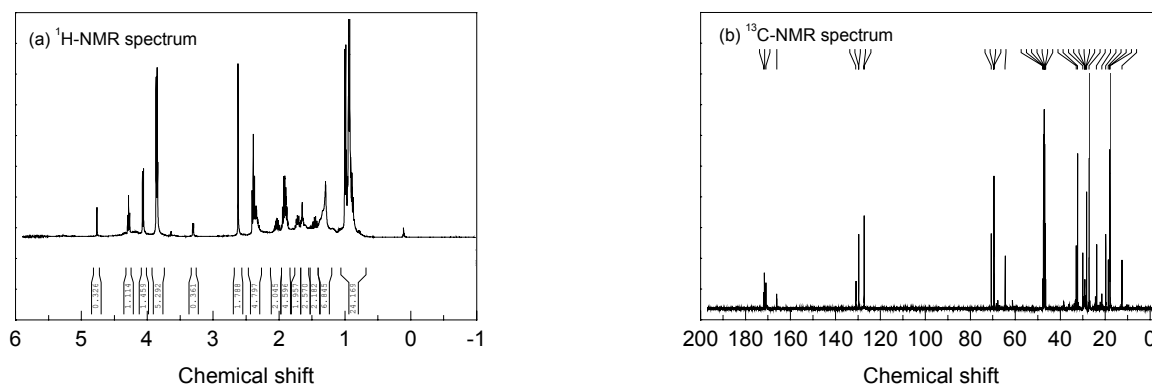


图5 化合物 B 的核磁共振谱
Fig.5 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of compound B

通过对化合物 B 的质谱解析, 可以对核磁共振结构分析手段可以进行相互确认. 电喷雾质谱(ESI)在正电离方式下得到准分子离子峰 $335 (\text{M}+\text{H})^+$, 见图 6, 这与化合物 B 的结构相符合, 因此确认该化合物为邻苯二甲酸-4-甲基-戊酯.

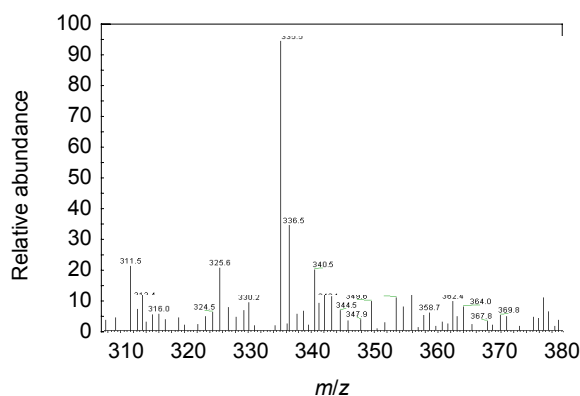


图6 化合物 B 的质谱图
Fig.6 The mass spectrum of compound B

3.3 藤黄灰链霉菌的脂肪酸酯合成与麦拓莱霉素生产的关系

根据分离到的初级代谢物脂肪酸酯的结构特性、大环内酯类抗生素聚酮代谢途径, 分析建立了藤黄灰链霉菌部分初级代谢和次级代谢关系图(见图 7), 包括糖酵

含有苯环结构, 为邻苯二甲酸脂肪酸酯衍生物, 因此可能为化合物 A 的同系物. $^1\text{H-NMR}$ 谱显示芳香质子信号 7.648 和 7.462, 可知分子呈现对称性. $^{13}\text{C-NMR}$ 显示碳总数为 20 个, 从低场向高场顺序依次有 2 个羰基碳(167.63), 2 个季碳(133.56), 6 个亚甲基碳(66.55, 34.04, 30.16), 6 个次甲基碳(132.26, 129.86, 28.91)及 4 个甲基碳(19.51, 19.41).

解、三羧酸(TCA)循环、合成菌体所需氨基酸的合成途径以及麦拓莱霉素合成途径等, 其中糖酵解、三羧酸循环和磷酸戊糖途径由生物化学基本资料推导而来, 这些是链霉菌中葡萄糖最重要的代谢途径. 此外, 分析结果显示, 该菌株可以产生氨基葡萄糖, 因此认为藤黄灰链霉菌中也存在类似途径, 提示其次级代谢产物中也含有氨基糖苷类化合物.

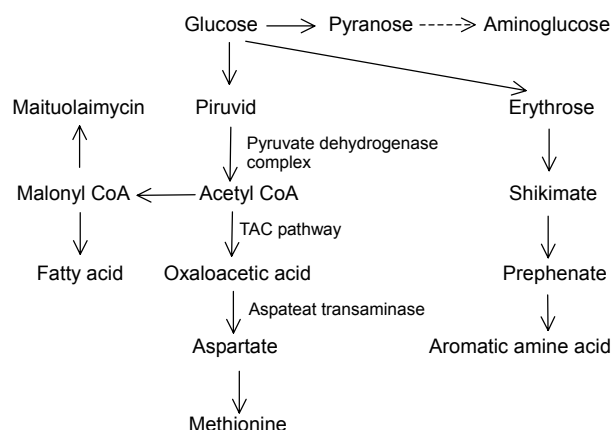


图7 藤黄灰链霉菌 099 的初级代谢和次级代谢关系
Fig.7 Conjectural relationship of primary metabolism and secondary metabolism in *streptomyces regensis* 099

以便于整体分析该菌种的脂肪酸酯初级代谢与麦拓莱霉素生产的关系, 不考虑中间各个具体的代谢产物

及所需的酶系, 将其看作一系列反应, 进行了一些合理的假设: (1) 为简化研究对象, 将培养菌体的 96 h 看作 1 个研究时期, 而不具体分析 96 h 内菌体的动态代谢变化; (2) 麦拓莱霉素的合成途径基于聚酮生物合成机理, 大环由前体乙酰 CoA 和丙酰 CoA 聚合而成, 结构修饰涉及天冬氨酸、蛋氨酸提供甲基等。由图 7 模型可知:

(1) 该菌株存在初级代谢产物脂肪酸酯, 因而存在与麦拓莱霉素聚酮合成途径类似的脂肪酸酯代谢途径。同时表明菌体中存在芳香氨基酸的代谢, 其前体均由初级代谢产物乙酰 CoA、琥珀酰 CoA 形成。

(2) 麦拓莱霉素与脂肪酸酯的合成途径均起始于乙酰辅酶 A, 但为不同的生物合成方向。由于二者均消耗乙酰辅酶 A, 因此表现为竞争性关系。若想提高发酵液中麦拓莱霉素的含量, 应该避免其初级代谢物脂肪酸酯的过渡产生, 即发酵初期能够维持菌体正常生长即可。

(3) 发酵工艺优化中, 应采取分批补料的方式发酵, 前期添加麦拓莱霉素的前体不能明显增加其含量, 且增加了发酵液中杂质脂肪酸酯的含量, 不利于提取。

(4) 文献[9]报道, 浅青紫链霉菌使用混合碳源有利于菌体生长和抗生素产量的提高。藤黄灰链霉菌以糖作为碳源时, 糖代谢过程中产生的乙酰辅酶 A 除用于合成麦拓莱霉素外, 部分乙酰辅酶 A 在初级代谢中用于合成脂肪酸酯。在发酵培养基中添加长链脂肪酸和长链脂肪

酸酯, 由于脂肪酸的 β 氧化产生乙酰辅酶 A, 在一定浓度范围内有利于菌体生长及麦拓莱霉素产量的提高。

3.4 藤黄灰链霉菌的脂肪酸酯合成与麦拓莱霉素生产关系的验证

发酵培养基中分别添加不同浓度的棕榈酸和三油酸甘油酯, 将发酵液于 4800 r/min 离心 20 min, 分别收集上清液与湿菌体, 上清液直接经有机溶剂萃取。采用枯草杆菌杯碟法监测发酵液活性, HPLC 检测麦拓莱霉素含量。菌体 80 °C 下干燥 24 h, 测量菌体干重, 结果如图 8 和 9 所示。不同浓度的棕榈酸和三油酸甘油酯均对菌体生长有促进作用, 低浓度的棕榈酸和三油酸甘油酯促进麦拓莱霉素合成, 高浓度则抑制合成, 发生了负反馈性调控。而不同浓度的短链脂肪酸均对麦拓莱霉素合成具抑制作用, 说明短链脂肪酸的加入诱导了脂肪酸代谢途径, 菌体直接利用短链脂肪酸代谢, 而脂肪酸合成又消耗了大量的乙酰 CoA, 与麦拓莱霉素的合成发生竞争, 从而使麦拓莱霉素产量降低。短链脂肪酸的浓度越高, 对菌体刺激越强, 代谢向脂肪酸代谢途径进行。与所建立的代谢模型中初级代谢途径脂肪酸酯与次级代谢途径麦拓莱霉素均来源于乙酰 CoA、二者具有竞争性相互抑制的结论相一致。而短链脂肪酸或长链脂肪酸菌体均可利用, 使菌体生长量增加, 这也与推测一致。

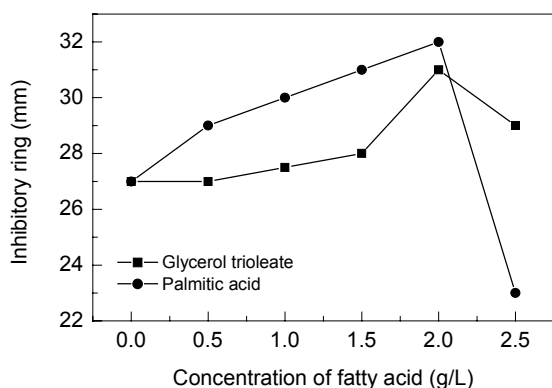


图 8 脂肪酸酯对麦拓莱霉素生物合成的影响

Fig.8 Effect of fatty acids on maituolaimycin biosynthesis

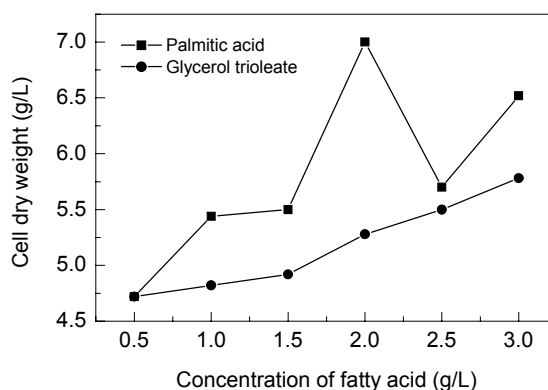


图 9 脂肪酸对菌体生物量的影响

Fig.9 Effect of fatty acids on biomass

4 结论

通过对麦拓莱霉素的发酵液定向分离, 得到了藤黄灰链霉菌 099 的初级代谢产物短链芳香脂肪酸酯, 经鉴定其结构分别为邻苯二甲酸-4-甲基-庚酯和邻苯二甲酸-4-甲基-戊酯。该系列芳香酸酯类成分发现不仅表明体系中存在芳香氨基酸的代谢, 也证明了麦拓莱霉素所代表的聚酮合成与脂肪酸酯合成关系密切。构建了相关的初级代谢与次级代谢关系, 通过实验对模型中的

代谢途径加以验证, 结果表明该代谢模型正确。

参考文献:

- [1] 元英进, 王志平, 王蕾, 等. 一种大环内酯类抗生素及其制备方法 [P]. 中国专利: 03130571. 2003-07-08.
- [2] 元英进, 王志平, 李霞, 等. 麦拓莱霉素的新型用途 [P]. 中国专利: 0410019544. 2004-09-06.
- [3] Omura S, Tannka Y. Biosynthesis of Tylosin and Its Regulation by Ammonium and Phosphate [M]. Berlin: VCH Publishers, 1986. 306.
- [4] Pospíšil S, Kopecký J, Prikrylová V, et al. Overproduction of 2-Ketoisovalerate and Monensin Production by Regulatory Mutants

- of *Streptomyces cinnamonensis* Resistant to 2-Ketobutyrate and Amino Acids [J]. FEMS Microbiol. Lett., 1999, 172(2): 197–204.
- [5] Sthapit B, Oh T J, Lamichhane R, et al. Neocarzinostatin Naphthoate Synthase: A Unique Iterative Type I PKS from Neocarzinostatin Producer *Streptomyces carzinostaticus* [J]. FEBS Lett., 2004, 566(1–3): 201–206.
- [6] Jonathan K, Karine A, Steven G K, et al. Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins during Lovastatin Biosynthesis [J]. Science, 1999, 284: 1368–1372.
- [7] Ryall K, Harper J T, Keeling P J. Plastid-derived Type II Fatty Acid Biosynthetic Enzymes in Chromists [J]. Gene, 2003, 313: 139–148.
- [8] Rajesh S G, Stuart Y T, David E C, et al. Dissecting and Exploiting Intermodular Communication in Polyketide Synthases [J]. Science, 1999, 284: 482–485.
- [9] Lynn P, John W, Colin R, et al. How *Streptomyces lividans* Uses Oils and Sugars as Mixed Substrates [J]. Enzyme Microb. Technol., 2003, 32: 157–166.
- [10] 徐岩, 章克昌, 王亚菲. 微生物脂肪酶对庚烷相中芳香酯的生物合成 [J]. 生物工程学报, 1998, 14(2): 214–219.

Relationship between Fatty Acid Ester and Maituolaimycin Production in *Streptomyces regnesis* 099

WANG Zhi-ping, LI Liang-zhi, YUAN Ying-jin

(Dept. Pharm. Eng., Sch. Chem. Eng. & Technol., Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: To establish the relationship between the biosynthetic pathway of a primary metabolite fatty acid ester and that of a novel macrolide maituolaimycin, a multi-separation chromatographic method was used to separate and purify the fatty acid ester from the fermentation broth of *Streptomyces regnesis* 099. And the structure of this fatty acid ester was identified using NMR and ESI-MS. A rational model was built in regard to the relationship of the two mentioned above and was validated by the fermentation experiments. The results showed that both polyketide biosynthetic pathway and fatty acid ester biosynthetic pathway existed in the strain, which is helpful to the optimization of fermentation technology.

Key words: metabolism; maituolaimycin; *Streptomyces regnesis* 099; fatty acid ester